

特集：再生医療とコンピュータサイエンス

視神経再生療法の未来

原田 高 幸

公益財団法人東京都医学総合研究所視覚病態プロジェクトプロジェクトリーダー

(平成26年3月2日受付) (平成26年3月3日受理)

はじめに

視神経は脳・脊髄などと同じ中枢神経であることから、一旦損傷されると回復が難しく、逆行性変性を起こすことが知られている。そして最終的には網膜神経節細胞 (RGC) が細胞死に陥って、不可逆的な視機能障害に至ると考えられる。したがって RGC が残存している時期に軸索再生が可能となれば、交通外傷や緑内障による視神経変性症の予防や治療にもつながることが期待される。これまでに軸索再生阻害因子に対する中和抗体や神経栄養因子の活用により、中枢神経の軸索再生を促す手法が多数報告されている。一方、われわれはグアニヌクレオチド交換因子の1つである Dock3が、成長円錐におけるアクチンおよび微小管重合の両者を刺激して、視神経再生を促進することを見出している。以上のような研究成果は人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を活用した神経細胞移植療法が可能になった場合にも、その後の神経回路網の再構築を考える上で極めて有用と思われる。

なぜ視神経再生療法が必要か？

眼球はしばしばカメラに例えられる。その場合、光の情報を最初に受け取る神経組織である網膜はフィルムに相当する。しかしその情報は視神経に伝えられ、脳の視覚野まで到達してはじめて目が見えたことになる。視神経は眼球の内層に位置する網膜神経節細胞 (RGC) の軸索が100万本以上集まったものであり、デジタルカメラでいえば、本体と記録媒体を接続するコードのような存在と考えられる (図1)。したがって交通事故や頭部外傷など、さまざまな原因で視神経が障害されると二次的な RGC 死が誘引され、結果的に視機能障害を引き起こし、最悪の場合には失明へと至ることになる。しかも網膜と視神経は中枢神経であるため、一旦障害を受ける

視神経は視覚情報を眼球から脳へ伝えるケーブル

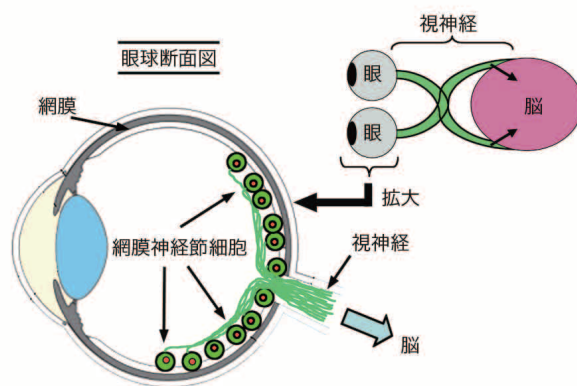
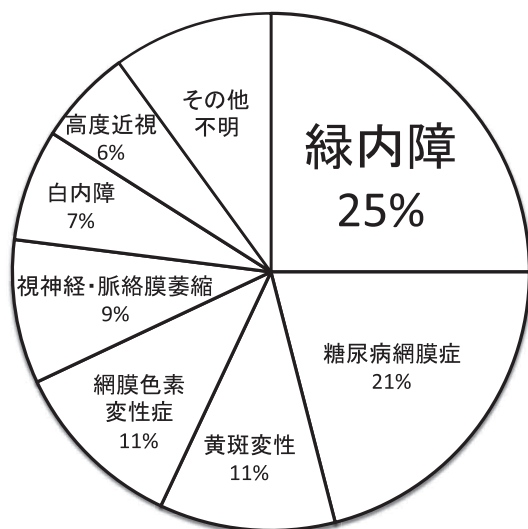


図1

と、根本的に治療することは困難である。

一方でわが国における失明原因¹⁾をみると視神経・脈絡膜萎縮は全体の1割にも満たないように思えるが、実際の臨床の場面ではより多くの病態で視神経変性を観察する機会がある (図2)。特にわが国で最大の失明原因である緑内障 (失明原因の約25%) では視神経障害とそれに伴う視野欠損が特徴的な所見とされており、40歳以上の罹患率は5%を超えている²⁾。したがって今後の高齢化社会においては、緑内障に対する根本的な治療法の確立がますます重要と考えられる。現在は眼圧 (眼球の内圧) を降下させる点眼薬や手術法がその主流となっているが、今後はより直接的な神経保護薬の登場や遺伝子治療法の確立が期待される。しかしそれだけでは失われた視機能が回復するものではない。そこで考えられるのが、まだ生き残っている自らの RGC を何らかの方法で刺激することにより、自然な視神経再生を促すという夢の治療である。また近年では iPS 細胞などの「万能細胞」から目的とする細胞を作り出して移植するという再生療

日本の失明原因の内訳



身体障害者手帳新規交付者の調査 中江ら(2006)より

図2

法に期待が集まっている。眼科領域では特にこうした研究が進んでおり、iPS細胞から分化させた網膜色素上皮細胞を加齢黄斑変性症患者へ移植する臨床試験が開始間近である。今のところRGCの分化法はまだ十分には確立しておらず、また視神経軸索を如何に視視野まで再投射させるかという問題も残る。しかし将来的にRGC移植が可能になることを想定すると、視神経再生研究はますます重要な段階に入ったと言えるだろう。

なぜ視神経は再生しないのか？

実験的に視神経損傷を起こすと、マウス、ラット、ネコなどの哺乳類では、ほとんど視神経が再生しないことが知られており、これはヒトと同様である。一方、魚類では視神経損傷後の1ヵ月程度で自然に視神経が再生し、行動学的検査でも視機能の回復が確認されている³⁾。また同じ哺乳類の神経でも末梢神経系には再生能力があることから、これらの再生メカニズムがわかれば、中枢神経の再生療法にも応用できる可能性がある。これまでの多くの研究から、哺乳類の中枢神経が再生しない原因の1つとして「再生阻害因子」の存在が特定されている(図3)。例えば損傷を受けた中枢神経系ではグリア細胞であるアストロサイトが活性化するが、反応性アストロサイトの増殖によって形成されたグリア瘢痕は物理的に軸

傷害された視神経はなぜ再生できないのか？

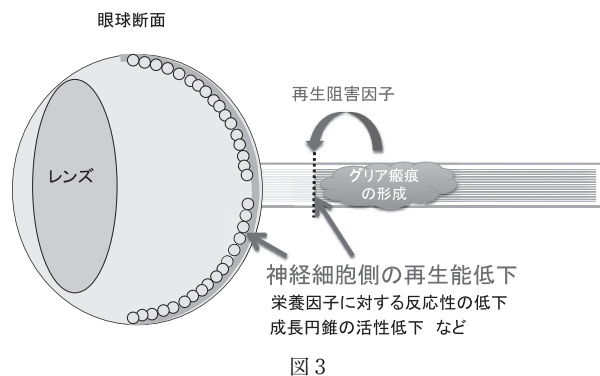


図3

索再生の障害になるだけでなく、神経突起伸長阻害因子として機能するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどを大量に含むことが知られている。さらに髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトからもNogoA, ミエリン関連糖蛋白質 (myelin-associated glycoprotein; MAG), オリゴデンドロサイトミエリン糖蛋白質 (oligodendrocyte-myelin glycoprotein; OMgP) などの再生阻害因子が産生される。RGCをはじめとする神経細胞にはこれらの受容体が存在し、再生阻害シグナルが伝達される。その際には低分子量G蛋白質であるRhoAやRho結合キナーゼ (ROCK) の活性化によって、軸索先端の構造物である成長円錐の虚脱と軸索進展の抑制が誘発される。中枢神経系のオリゴデンドロサイトと異なり、末梢神経系の髄鞘形成細胞であるシュワン細胞では神経阻害因子の分泌量は少なく、逆に各種の神経栄養因子を放出することにより、神経の修復や再生を促進するとされている。さらにコンドロイチナーゼABCによるグリア瘢痕の除去や、再生阻害因子の中和抗体により、哺乳類でもある程度の軸索再生が可能なが報告されている⁴⁾。魚類などでは再生阻害因子やその受容体が哺乳類より少ないことも報告されており、こうした内在性の再生能を活用する手法は今後も注目される。

神経炎症による軸索再生メカニズム

ラット眼球では水晶体に傷をつけたり、眼球内に炎症を誘導するzymosan (酵母の細胞壁粗画分) を投与すると、好中球やマクロファージが眼内に浸潤し、強い視神経再生効果を得られる(図4)。その際に炎症性細胞から放出される因子としてカルシウム結合蛋白質の1つ

炎症による視神経再生

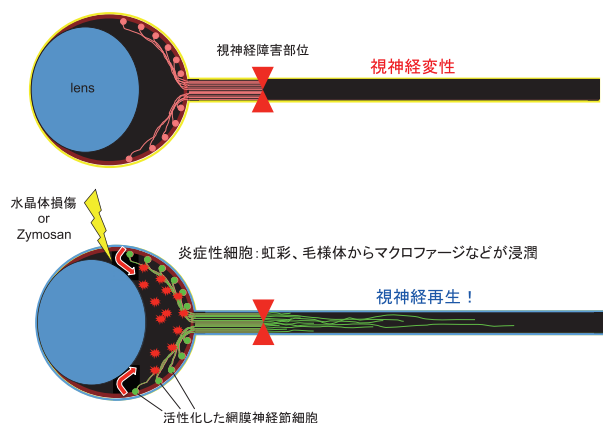


図 4

である oncomodulin が同定されている⁵⁾。また細胞内 cyclic AMP の眼球内注射を追加すると oncomodulin の産生が増加して、zymosan による視神経再生が促進される。さらに脱リン酸化酵素である phosphatase and tensin homolog (PTEN) の RGC 特異的欠損マウスにおいては、mammalian target of rapamycin (mTOR) の経路を介した、強い軸索伸長効果が報告されている。そこで PTEN 欠損マウスの眼球内に oncomodulin と cyclic AMP を投与すると、ほぼ視神経全長に渡る視神経の再生が観察され、一部は視交叉にまで到達した^{6,7)}。またこのマウスでは行動学的にある種の視機能回復が見られたことから、他の因子や手法の追加によって、さらなる視機能の向上が期待される。

成長円錐を刺激する Dock3とは？

ここまでグリア瘢痕の形成や再生阻害因子の抑制、神経炎症の活用による軸索再生法を紹介したが、これらとは異なる手法として、成長円錐をより直接的に刺激することが考えられる。そこで最近われわれはグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor; GEF) の1つである Dock3の機能に注目している⁸⁾。GEF は Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rac1, Cdc42, RhoA など) の活性を制御することにより、細胞内でアクチン細胞骨格の再構築を調節している。たとえば Rac1 が細胞の先端部で活性化すると、アクチン骨格の重合促進により平板な葉状仮足 (ラメリポディア) が形成される。こうした機能は神経細胞でも重要であり、外界から

の刺激に応じて細胞骨格を使って形態を変化させることにより、細胞極性や軸索誘導にも関与することが知られている。GEF はこれまでに約80種類が知られているが、以前から良く知られている Double-homology domain (DH ドメイン) を持つグループと、Dock homology region (DHR) と呼ばれる独自の活性化領域を持つグループに大別される。このうち後者は Dock ファミリーと呼ばれる分子量180-240kDa の分子ファミリーで、これまでに11種類 (Dock1~11) が同定されている。このうち Dock1 (Dock180) はアポトーシス細胞の食作用や筋芽細胞の融合などに重要な役割を持ち、そのシグナルネットワークに関しては国内外の研究者によって比較的多くの研究がなされている⁹⁾。また Dock2はリンパ球の走化性に、Dock4の変異はさまざまな癌の発生や転移に関与することが報告され、Dock family の生理活性は多岐に渡ることが予想される¹⁰⁾。

このような Dock family のうち Dock3は別名で Modifier of cell adhesion protein (MOCA) と呼ばれ、アルツハイマー病の原因遺伝子産物である presenilin に結合する新規蛋白質として発見された。その後 Dock3は Amyloid precursor protein (APP) の分解を促進することや、アルツハイマー病患者の脳で減少することが報告されたが、病態との関係は不明のままである¹¹⁾。われわれは Dock3が主に中枢神経系に分布し、Rac1を特異的に活性化することを報告した¹²⁾。そこで引き続き Dock3を海馬の初代培養細胞に過剰発現させたところ、有意な軸索伸長効果があることを見出した。また Dock3による軸索伸長には、強力な神経栄養因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF) との相乗効果が確認された¹³⁾。BDNF は脳の発生や学習・記憶といった高次機能にも関与することから、Dock3欠損マウスでは神経軸索の形成不全などが予想される。しかし意外なことに Dock3欠損マウスの軸索変性は極めて軽微だった¹⁴⁾。この原因としては、DHR-2領域に存在する活性中心が Dock1~4でほぼ共通していることが考えられる¹³⁾。活性中心のアミノ酸配列を変異させた Dock3では Rac1活性が大幅に低下し、軸索伸長効果も失われていた。それでは Dock3による軸索伸長のメカニズムとはどのようなものであろうか？

Dock3による視神経再生メカニズムと緑内障治療への応用

Rac1の下流ではアクチンの重合を促進する WAVE

(WASP family verprolin-homologous protein) と呼ばれる蛋白が活性化され、葉状仮足形成を引き起こすことが知られている¹⁵⁾。研究の過程でわれわれは Dock3 が細胞質中で WAVE と複合体を形成し、しかもその結合部位はこれまで十分に機能が解明されていない DHR-1 領域であることを見出した (図 5)。Dock3 と WAVE 蛋白の複合体は BDNF の刺激によって成長円錐の細胞膜に輸送され、また Dock3 は細胞膜上でリン酸化を受ける。リン酸化 Dock3 は Rac1 の活性を高める一方で、WAVE との結合能は大きく低下していた。WAVE が細胞膜上で Rac1 と結合してアクチン繊維を活性化することを考慮すると、Dock3 は自ら Rac1 活性を高めるだけでなく、細胞膜近傍に WAVE を供給するというダブル作用で効率良くアクチン繊維の重合と軸索伸長を促進している可能性がある¹³⁾。

一方、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β (glycogen synthase kinase-3 β ; GSK-3 β) は β -catenin やタウ蛋白などを含む広範囲にわたる蛋白質をリン酸化するセリン/スレオニンキナーゼであり、糖尿病やアルツハイマー病などへの関与が知られている。しかし GSK-3 β は下流の collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) のリン酸化を介して神経極性を制御することが明らかになっており、軸索伸長メカニズムにも寄与することが推定される¹⁶⁾。われわれは Dock3 が DHR-2 領域の近傍で

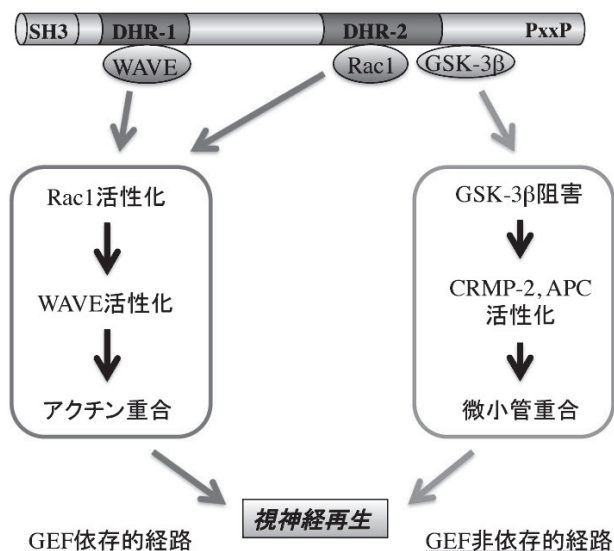


図 5 Dock3 結合分子と軸索再生のメカニズム
Dock3 は異なる部位に結合する蛋白質を使い分けて GEF 活性依存のおよび非依存的経路を駆使することにより、効率良く軸索伸長を促進すると考えられる。

GSK-3 β と結合し、リン酸化 (不活化) を誘導することを明らかにした (図 5)。リン酸化 GSK-3 β は CRMP-2 に加えて adenomatous polyposis coli (APC) を活性化し、その結果として微小管の重合を促進したが、Rac1 活性には変化を与えなかった。以上から Dock3 は GEF 活性非依存的な経路によっても、細胞骨格の制御が可能であることが示された¹⁷⁾。

わが国で最大の失明原因である緑内障においては、視神経変性とそれに伴う視野障害 (見える範囲が狭まる) が問題となっていることは前述の通りである。一方、視神経変性が始まっても緑内障の進行は極めて緩徐であり、一定期間は RGC の細胞体は正常であると考えられている。したがって細胞体が消失する前に軸索伸長を誘導できれば、新たな治療法につながる可能性がある。そこで Dock3 の遺伝子過剰発現 (Dock3 Tg) マウスを作製して視神経損傷実験を行ったところ、野生型マウスよりも視神経の再生が有意に亢進することがわかった (図 6)。さらに再生中の視神経軸索にはリン酸化 GSK-3 β の発現が確認された。以上から Dock3 は GEF 活性依存のおよび非依存的な複数の経路を介して、アクチンと微小管

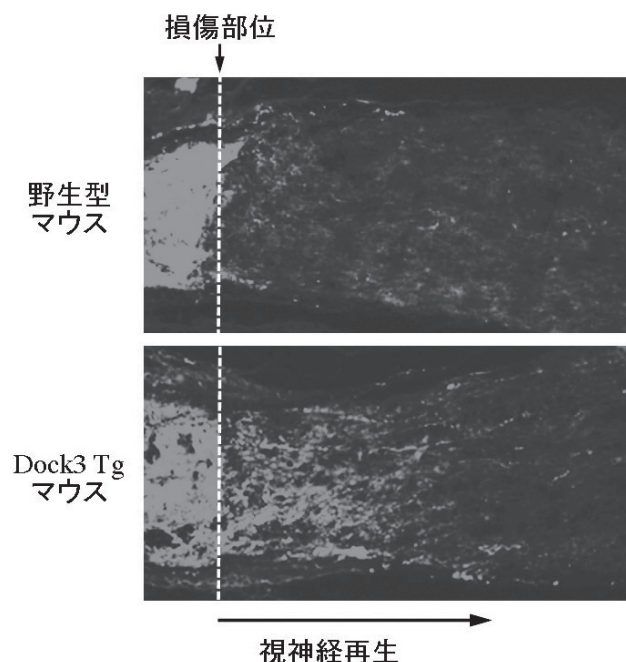


図 6 Dock3 過剰発現マウスにおける視神経外傷後の軸索再生の亢進
点線は視神経の損傷部位を示す。GAP43 による染色の結果、Dock3 過剰発現 (Tg) マウスでは野生型マウスと比較して、有意な軸索再生の促進が観察された。

それぞれの細胞骨格を制御するとともに、視神経軸索の伸長に関与することが示された。当研究室では日本の緑内障の7割を占める「正常眼圧緑内障」に関して、世界初の疾患モデル動物を確立している¹⁸⁾。今後はこのモデル動物に対する Dock3 の遺伝子治療実験を行い、さらに有効性の検討を進めていく予定である。

おわりに

視神経再生に関する最近の知見（再生阻害因子の抑制、神経炎症の活用など）に加えて、Dock3 を活用した成長円錐の活性化について概要をまとめた。最近では Dock3 に神経保護作用があることが確認されたことから¹⁹⁾、これら複数の手法を包括的に行うことにより、さらなる視神経再生の促進と視機能回復が期待される。iPS 細胞の臨床応用も見据えて、視神経再生療法が実際の臨床で実現するように引き続き努力していきたい。

文 献

- 1) 中江公裕, 増田寛次郎, 妹尾正, 小暮文雄 他: わが国における視覚障害の現状. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業, 網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究班, 平成17年度報告書: 263-267, 2006
- 2) Iwase, A., Suzuki, Y., Araie, M., Yamamoto, T., *et al.*: The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology*, 111: 1641-1648, 2004
- 3) Kato, S., Matsukawa, T., Koriyama, Y., Sugitani, K., *et al.*: A molecular mechanism of optic nerve regeneration in fish: the retinoid signaling pathway. *Prog. Retin. Eye Res.*, 37: 13-30, 2013
- 4) Chew, D. J., Fawcett, J. W., Andrews, M. R.: The challenges of long-distance axon regeneration in the injured CNS. *Prog. Brain Res.*, 201: 253-294, 2012
- 5) Yin, Y., Henzl, M. T., Lorber, B., Nakazawa, T., *et al.*: Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat. Neurosci.*, 9: 843-852, 2006
- 6) Kurimoto, T., Yin, Y., Omura, K., Gilbert, H. Y., *et al.*: Long-distance axon regeneration in the mature optic nerve: contributions of oncomodulin, cAMP, and pten gene deletion. *J. Neurosci.*, 30: 15654-15663, 2010
- 7) de Lima, S., Koriyama, Y., Kurimoto, T., Oliveira, J. T., *et al.*: Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109: 9149-9154, 2012
- 8) 行方和彦, 原田高幸: 神経軸索の再生における Dock3 の機能. *生化学*, 84: 368-373, 2012
- 9) Katoh, H., Negishi, M.: RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature*, 424: 461-464, 2003
- 10) Côté, J. F., Vuori, K.: GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.*, 17: 383-393, 2007
- 11) Kashiwa, A., Yoshida, H., Lee, S., Paladino, T., *et al.*: Isolation and characterization of novel presenilin binding protein. *J. Neurochem.*, 75: 109-116, 2000
- 12) Namekata, K., Enokido, Y., Iwasawa, K., Kimura, H.: MOCA induces membrane spreading by activating Rac1. *J. Biol. Chem.*, 279: 14331-14337, 2004
- 13) Namekata, K., Harada, C., Taya, C., Guo, X., *et al.*: Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107: 7586-7591, 2010
- 14) Chen, Q., Peto, C. A., Shelton, G. D., Mizisin, A., *et al.*: Loss of modifier of cell adhesion reveals a pathway leading to axonal degeneration. *J. Neurosci.*, 29: 118-130, 2009
- 15) Takenawa, T., Suetsugu, S.: The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 37-48, 2007
- 16) Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., *et al.*: GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, 120: 137-149, 2005
- 17) Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kimura, A., *et al.*: Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3 β -mediated microtubule assembly. *J. Neurosci.*, 32: 264-274, 2012
- 18) Harada, T., Harada, C., Nakamura, K., Quah, H. M., *et al.*: The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J. Clin. Invest.*, 117: 1763-1770, 2007
- 19) Namekata, K., Kimura, A., Kawamura, K., Guo, X., *et al.*

al. : Dock3 attenuates neural cell death due to NMDA neurotoxicity and oxidative stress in a mouse model

of normal tension glaucoma. *Cell Death Differ.*, 20 : 1250-1256, 2013

The future of optic nerve regeneration therapy

Takayuki Harada

Visual Research Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

SUMMARY

The optic nerve is a part of the central nervous system (CNS) and convey visual signals from the retina along their axons to the brain. Axonal damage can be induced by trauma, ischemia or in glaucoma, the most common cause of blindness in Japan. Like other CNS axons, the optic nerve has a very limited regenerative capacity. However, recent advances in research have revealed that combinational treatments, for example, overcoming the inhibitory environment of the glial scar and activating the intrinsic growth program, yield robust optic nerve regeneration. In addition, we revealed that overexpression of dedicator of cytokinesis 3 (Dock3), one of the atypical Rho-guanine nucleotide exchange factors (Rho-GEFs), plays important roles in promoting optic nerve regeneration. In response to the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Dock3 activates multiple pathways that stimulate both actin polymerization and microtubule assembly, which are processes involved in neuroregeneration. Furthermore, Dock3 prevents glaucomatous retinal degeneration by suppressing both glutamate neurotoxicity and oxidative stress, suggesting that Dock3 signaling is a potential therapeutic target for both optic nerve regeneration and retinal neuroprotection. Based on our current knowledge, a combinatory approach including stimulation of Dock3 signalling may be effective for the treatment of complex diseases such as glaucoma, and this type of strategy may be available for future regeneration therapy using induced pluripotent stem (iPS) cells.

Key words : optic nerve regeneration, retina, neuroprotection, glaucoma, Dock3